

PCT

EP US

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
 (PCT18条、PCT規則43、44)

出願人又は代理人 の書類記号 IAT-630	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/06172	国際出願日 (日.月.年) 05.11.99	優先日 (日.月.年) 06.11.98
出願人(氏名又は名称) 株式会社ヤトロン		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
 この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
 第 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-1999年

日本国登録実用新案公報 1994-1999年

日本国実用新案登録公報 1996-1999年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSYS (DIALOG)

WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Nature Biotechnology, Vol. 14, No. 8 (1996) p. 1007-1011	13 1-12, 14-23
Y	J P, 59-142466, A (富士レビオ株式会社) 15. 8 月. 1984 (15. 08. 84) 特許請求の範囲 (ファミリーな し)	1-12, 14-23
Y	J P, 3-128460, A (日本商事株式会社) 31. 5月. 1 991 (31. 05. 91) 特許請求の範囲 & E P, 40557 8, A & U S, 5378608, A	8, 19-23

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29. 11. 99

国際調査報告の発送日

07.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子



2 J

9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 8-308578, A (キッコーマン株式会社) 26. 11 月. 1996 (26. 11. 96) 特許請求の範囲&US, 581 4465, A&US, 5843746, A	10, 11



2



(51) 国際特許分類6 G01N 33/53	A1	(11) 国際公開番号 WO00/28326 (43) 国際公開日 2000年5月18日(18.05.00)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06172</p> <p>(22) 国際出願日 1999年11月5日(05.11.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/316172 1998年11月6日(06.11.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ヤترون (IATRON LABORATORIES, INC.)(JP/JP) 〒101-0031 東京都千代田区東神田1丁目11番4号 Tokyo, (JP) キッコーマン株式会社 (KIKKOMAN CORPORATION)(JP/JP) 〒278-8601 千葉県野田市野田250番地 Chiba, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 杉山和之(SUGIYAMA, Kazuyuki)(JP/JP) 星野信広(HOSHINO, Nobuhiro)(JP/JP) 〒101-0031 東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社 ヤترون内 Tokyo, (JP) 辰巳宏樹(TATSUMI, Hiroki)(JP/JP) 福田 賢(FUKUDA, Satoshi)(JP/JP) 〒278-8601 千葉県野田市野田250番地 キッコーマン株式会社内 Chiba, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 森田憲一(MORITA, Kenichi) 〒173-0004 東京都板橋区板橋二丁目67番8号 板橋中央ビル5階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: NOVEL COMPLEXES CONTAINING CROSSLINKED AVIDIN, ANALYTICAL METHOD WITH THE USE OF CROSSLINKED AVIDIN AND ANALYTICAL REAGENTS AND KITS</p> <p>(54)発明の名称 架橋アビジン含有新規複合体、架橋アビジンを用いる分析方法、並びに分析用試薬及びキット</p> <p>(57) Abstract Novel complexes containing crosslinked avidin, an analytical method and analytical reagents and kits whereby a subject compound to be analyzed can be quickly, conveniently and accurately analyzed while taking advantage of the avidin-biotin reaction. The above complexes contain at least two homogeneous or heterogeneous materials having biotin introduced thereinto and one crosslinked avidin inserted between these materials. In the above analytical method, use is made of homogeneous or heterogeneous materials having biotin introduced thereinto and the crosslinked avidin. The above analytical reagents contain the above-described crosslinked avidin. The above analytical kits contain the above-described crosslinked avidin and a biotinylation agent.</p>		

アビジン-ビオチン反応の長所を生かしながら、迅速且つ簡易に、しかも、正確に分析対象化合物の分析を実施することができる架橋アビジン含有新規複合体、分析方法、並びに分析用試薬及びキットを提供する。

前記複合体は、同種又は異種のビオチン導入物少なくとも2個と、前記ビオチン導入物の間に挟まれた架橋アビジン1個とを含む。前記分析方法では、同種又は異種のビオチン導入物と、架橋アビジンとを使用する。前記分析用試薬は、前記架橋アビジンを含む。前記分析用キットは、前記架橋アビジン及びビオチン化剤を含む。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CJ	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

明 細 書

架橋アビジン含有新規複合体、架橋アビジンを用いる分析方法、
並びに分析用試薬及びキット

技術分野

本発明は、架橋アビジンを含む新規複合体、前記新規複合体の製造方法、架橋アビジンを用いる分析方法、並びに分析用試薬及び分析用キットに関する。なお、本明細書における「分析」には、分析対象化合物の存在の有無を判定する「検出」と、分析対象化合物の存在量を決定する「定量」との両方が含まれる。

背景技術

抗原抗体反応を利用した高感度測定法の一つに酵素免疫測定法があり、代表的なものとして、ヘテロジニアスエンザイムイムノアッセイ、例えば、固相化抗体と標識化抗体とを用いたサンドイッチ法、又は固相化抗体と標識化抗原とを用いた競合法等がある。

これらの方法で用いられる酵素標識化抗原又は酵素標識化抗体は、種々の方法で調製されてきた。例えば、初期には、抗原又は抗体と酵素との混合液に、二価性の反応性を有するグルタルアルデヒドを加え、抗原又は抗体と酵素とのポリマーをランダムに調製する方法が開発された。その後、ペルオキシダーゼの表面アミノ基が少ないこと、そして、化学反応試薬に対しての耐性が強いことを利用した改良も試みられた。すなわち、まず、ペルオキシダーゼにグルタルアルデヒドを反応させた後に、過剰のアルデヒド基を除去し、得られたアルデヒド導入ペルオキシダーゼと、抗体とを混合することにより、必要な酵素標識化抗体のみを合成する方法が開発された。また、ペルオキシダーゼが糖鎖を持つことを利用して、過ヨウ素酸で糖鎖を酸化してアルデヒドを生じさせ、抗体のアミノ基と結合させることにより、高収率に酵素標識化抗体を得る方法も開発された。

一方、種々の架橋剤も開発され、抗体と酵素とを結合する反応に用いられるようになった。その中でも、スクシンイミドとマレイミド基とを両端に持つような

ヘテロバイファンクショナルな架橋剤が開発され、酵素のアミノ基と抗体のヒンジ領域のSH基とを特異的に結合し、収率良く酵素標識化抗体を得ることもできるようになった。

抗原又は抗体と酵素とを架橋剤で結合する前記方法以外にも、アビジン-ビオチン反応を利用した抗原又は抗体と酵素との結合方法も開発されてきた。この方法では、二つの試薬を組み合わせて使用する方法が一般的である。すなわち、一方では、ビオチン化試薬を用いることにより、抗原又は抗体にビオチンを導入した抗原又は抗体（ビオチン導入抗原又はビオチン導入抗体）を調製しておく。他方では、（１）化学結合法により、酵素とアビジンとの複合体（酵素標識化アビジン）を調製しておくか、あるいは、（２）ビオチン導入酵素とアビジンとを適当な比率で混合することにより、ビオチンを介した酵素とアビジンとの複合体（酵素標識化アビジン）を調製しておく。

ここで、前記化学結合法（１）は、酵素とアビジンとを、グルタルアルデヒド又はヘテロバイファンクショナルな架橋剤で結合するもので、酵素と抗体との組合せに代えて、酵素とアビジンとを組み合わせること以外は、前記の酵素標識化抗体調製法をそのまま利用することができる。

一方、前記方法（２）で使用する前記ビオチン導入酵素は、酵素として、例えば、ルシフェラーゼを使用する場合に、遺伝子操作法により得ることができる。例えば、ルシフェラーゼの遺伝子とビオチンアクセプターの遺伝子とを連結させた遺伝子を宿主細胞内で発現させると、ルシフェラーゼ-ビオチンアクセプター融合タンパク質が宿主細胞内で合成され、続いて、この融合タンパク質に、宿主細胞の働きによりビオチンが結合され、ビオチン導入酵素（ビオチンが導入されたルシフェラーゼ-ビオチンアクセプター融合タンパク質）を得ることができる。

このようにして得られたビオチン導入抗原又はビオチン導入抗体と、酵素標識化アビジンとを用いる方法では、例えば、一般に、分析対象化合物（抗原）を含む被検試料と、抗体固定化担体とを反応させた後、洗浄操作を行い、次に、前記ビオチン導入抗体を反応させ、再び洗浄を行った後、酵素標識化アビジンを反応させ、抗体固定化担体と分析対象化合物との複合体に結合した酵素標識化アビジン由来の酵素量を測定することにより、抗原量を知ることができる。

このようなアビジン-ビオチン反応を利用した免疫測定法は、予め酵素標識化アビジンを調製しておけば、種々の抗体をビオチン化するだけで標識物として使用することができるという点や、化学的な処理で活性に大きなダメージを受ける酵素でも、遺伝子操作でビオチン導入酵素として発現させることにより、活性を維持したまま酵素標識化アビジンとして用いることができるというメリットがあるが、操作ステップが多くなることや、測定毎のデータに再現性が乏しいという欠点を持っている。

反応ステップを減らすために、ビオチン導入抗体、アビジン、及びビオチン導入酵素の三者を予め混合して、酵素標識化抗体（ビオチン導入抗体-アビジン-ビオチン導入酵素複合体）として用いる試みもなされたが、反応性が著しく低下したり、安定性が非常に悪くなったりして、そのままでは試薬として使用することはできなかった。

また、前記アビジン-ビオチン反応は、前記の免疫学的分析方法以外にも、DNAプローブを用いるDNA又はRNA分析方法、あるいは、受容体-リガンド分析方法にも適用されており、これらの分析方法にアビジン-ビオチン反応を適用した場合にも、免疫学的分析方法と同様の問題があった。

従って、本発明の課題は、前記の従来技術の欠点を解消し、アビジン-ビオチン反応の長所を有しながら、操作ステップが少なく、迅速且つ簡易であって、しかも、正確な分析方法を提供することにある。

発明の開示

本発明は、同種又は異種のビオチン導入物少なくとも2個と、前記ビオチン導入物の間に挟まれた架橋アビジン1個とを含む、ビオチン-アビジン-ビオチン型複合体に関する。

本発明の前記ビオチン-アビジン-ビオチン型複合体においては、前記ビオチン導入物の少なくとも1個が、ビオチン導入結合成分であり、前記ビオチン導入物の少なくとも1個が、ビオチン導入標識物質であることが好ましい。

また、本発明は、(1)アビジンを架橋剤で処理することにより、架橋アビジンを調製する工程、

(2) 同種又は異種のビオチン導入対象物をビオチン化することにより、同種又は異種のビオチン導入物を調製する工程、及び

(3) 前記架橋アビジンと、同種又は異種の前記ビオチン導入物とを結合させることにより、前記ビオチン-アビジン-ビオチン型複合体を形成させる工程を含むことを特徴とする、前記ビオチン-アビジン-ビオチン型複合体の製造方法に関する。

また、本発明は、同種又は異種のビオチン導入物と、架橋アビジンとを使用することを特徴とする、分析方法に関する。

また、本発明は、(1) ビオチン導入結合成分、(2) 架橋アビジン、及び(3) ビオチン導入標識物質を使用することを特徴とする、分析方法に関する。

また、本発明は、(1) 分析対象物を含む可能性のある被検試料、前記分析対象物と特異的に結合可能なビオチン導入結合成分、架橋アビジン、及びビオチン導入標識物質を任意の順序で接触させることにより、前記分析対象物とビオチン導入結合成分と架橋アビジンとビオチン導入標識物質との複合体を形成させる工程、及び

(2) 前記複合体における前記標識物質に由来する信号を分析する工程を含むことを特徴とする、前記分析対象物の分析方法に関する。

また、本発明は、架橋アビジンを含むことを特徴とする、分析用試薬に関する。

また、本発明は、架橋アビジン及びビオチン化剤を含むことを特徴とする、分析用キットに関する。

更に、本発明は、(1) ビオチン導入結合成分、(2) 架橋アビジン、及び(3) ビオチン導入標識物質を含むことを特徴とする、分析用キットに関する。

本明細書における「分析」とは、「結合分析」、すなわち、2種類の化合物が相互に特異的に結合する性質を利用して、2種類の前記化合物の内のいずれか一方を分析対象化合物とし、それと特異的に結合可能な「結合成分」を用いて前記分析対象化合物を分析することを意味する。特異的な結合を示す前記の2種類の化合物の組み合わせとしては、例えば、抗原と抗体との組み合わせ、DNAとそれに相補的なDNA若しくはRNAとの組み合わせ、RNAとそれに相補的なDNA若しくはRNAとの組み合わせ、受容体とそのリガンド（例えば、ホルモン、

サイトカイン、神経伝達物質、又はレクチン）との組み合わせ、酵素とそのリガンド（例えば、酵素の基質アナログ、補酵素、調節因子、又は阻害剤）との組み合わせ、酵素アナログとその酵素アナログの元となる酵素の基質との組み合わせ、又はレクチンと糖との組み合わせを挙げることができる。なお、「酵素アナログ」とは、元の酵素に対する基質との特異的な親和性は高いものの、触媒活性を示さないものをいう。

図面の簡単な説明

図1は、架橋ストレプトアビジンを用いるELISA法により、AFPを測定した結果を示すグラフである。

図2は、架橋されていないストレプトアビジンを用いるELISA法により、AFPを測定した結果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本発明のビオチン-アビジン-ビオチン型複合体は、同種又は異種のビオチン導入物2個以上と、前記ビオチン導入物の間に挟まれた架橋アビジン1個とを含む。前記ビオチン導入物の各々と前記架橋アビジンとの各結合は、ビオチン-アビジン反応による結合である。

本発明では、「アビジン」として、ビオチンに特異的に強く結合することのできる任意のアビジン、例えば、卵白アビジン、ストレプトアビジン、又は遺伝子操作で得られたアビジン（すなわち、リコンビナントアビジン）等を用いることができる。

アビジンは、同一のサブユニット4個からなるタンパク質である。各サブユニットにはビオチン結合部位が1箇所ずつ存在するため、1分子のアビジンには4分子のビオチンが結合することができる。各サブユニットは共有結合で結合していないため、アビジンに高い熱が加わると、各サブユニットに開裂してしまうことが知られている。

本発明において使用する架橋アビジンは、アビジンの少なくともサブユニット間が架橋（すなわち、分子内架橋）されているものを意味する。前記架橋アビジ

ンには、アビジン1分子のみからなる架橋アビジンモノマー、及び複数のアビジン分子が、更に分子間架橋により共有結合で結合されている架橋アビジンポリマーの両方が含まれる。

前記の架橋アビジンは、アビジンを架橋剤で処理することにより得ることができる。前記架橋剤としては、例えば、アミノ基同士を結合する架橋剤としてのグルタルアルデヒド、ジスクシンイミド、ジメチルピメルイミデート、若しくはジメチルスベルイミデート、又はアミノ基とカルボキシ基とを縮合反応させる架橋剤としての種々のカルボジイミド〔例えば、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド等〕を使用することができる。

本発明において使用するビオチン導入物は、任意のビオチン導入対象物をビオチン化したものである。前記ビオチン導入対象物としては、ビオチン化可能であり、しかも、ビオチン化した後のビオチン導入物が、ビオチン-アビジン反応を介して架橋アビジンと結合可能である限り、特に限定されるものではなく、溶液中の任意の物質（例えば、通常の免疫学的分析方法において抗体又は抗原を標識するのに使用することのできる標識物質、あるいは、ビオチンを導入可能な結合成分）であることができる。

前記標識物質としては、例えば、酵素、蛍光物質若しくは蛍光物質結合タンパク質、発光物質若しくは発光物質結合タンパク質、又は放射性同位元素を挙げることができる。

前記酵素としては、例えば、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコキナーゼ、ヘキソキナーゼ、又はグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G 6 P D H）を挙げることができる。

前記蛍光物質としては、例えば、フルオレッセイン、ローダミン、ダンシルクロライド、フルオロニトロベンゾフラザン、ユーロピウムキレート、又はサマリウムキレートを挙げることができ、前記蛍光物質結合タンパク質としては、前記蛍光物質をタンパク質に結合し、蛍光物質を集積したものを挙げることができる。

前記発光物質としては、例えば、アクリジウムエステル、アダマンチルジョキサン、又はイソルミノールを挙げることができ、前記発光物質結合タンパク質

としては、前記発光物質をタンパク質に結合し、発光物質を集積したものを挙げることができる。

前記放射性同位元素としては、例えば、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、又は ^3H を挙げることができる。

本発明において使用することのできるビオチン導入酵素は、例えば、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、又は β -D-ガラクトシダーゼ等の酵素をビオチン化したものである。

このようなビオチン導入酵素は、例えば、化学的修飾法又は遺伝子操作法を用いることにより調製することができる。

前記化学的修飾法は、酵素アミノ酸残基に対して化学的にビオチンを結合させる方法である。

一方、前記遺伝子操作法は、酵素とビオチンアクセプターとの融合タンパク質を宿主細胞中で発現させることにより、ビオチン導入酵素を得るものである。化学的修飾に対して非常に不安定である酵素（例えば、ルシフェラーゼ等）の場合には、遺伝子操作法を用いることが好ましい。前記ビオチンアクセプターとは、宿主細胞中でビオチンを付加される一定のアミノ酸配列を含むタンパク質の総称であり、目的に応じてアクセプタータンパク質に翻訳される配列を含む遺伝子を用いることができる。

酵素（例えば、ルシフェラーゼ）の遺伝子とビオチンアクセプターの遺伝子とを連結させた遺伝子を宿主細胞内で発現させると、酵素-ビオチンアクセプター融合タンパク質が宿主細胞内で合成され、続いて、この融合タンパク質に、宿主細胞の働きによりビオチンが結合され、ビオチン導入酵素（ビオチンが導入された酵素-ビオチンアクセプター融合タンパク質）を得ることができる。

本発明において使用することのできるビオチン導入標識物質の内、ビオチン導入酵素以外のものについては、公知の方法を用いて調製することができる。

本発明において使用することのできるビオチン導入結合成分における前記結合成分は、ビオチンを導入することができ、しかも、分析対象物と特異的に結合可能な結合成分である限り、特に限定されるものではなく、例えば、（a）タンパク質である抗体（モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体の両方を含む）、

抗体フラグメント〔例えば、 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、又は Fv 〕、タンパク質抗原、受容体、タンパク質ホルモン、サイトカイン、レクチン、酵素、又は酵素アナログ、(b) 核酸であるDNA又はRNA、あるいは、(c) タンパク質又は核酸以外の化合物である非タンパク質抗原、非タンパク質ホルモン、酵素に対するリガンド（例えば、酵素の基質アナログ、補酵素、転写因子、若しくは阻害剤）、酵素アナログの元となる酵素の基質、又は糖を挙げることができる。

本発明において使用することのできるビオチン導入結合成分の内、結合成分がタンパク質であるもの（例えば、抗体、抗体フラグメント、タンパク質抗原、受容体、タンパク質ホルモン、サイトカイン、レクチン、酵素、又は酵素アナログ）については、ビオチン導入酵素に関して説明した前記の調製方法、すなわち、化学的修飾法又は遺伝子操作法を用いて、結合成分にビオチンを導入することにより調製することができる。

また、本発明において使用することのできるビオチン導入結合成分の内、結合成分が核酸であるもの（例えば、DNA又はRNA）については、公知の方法を用いて、結合成分にビオチンを導入することにより調製することができる。前記公知方法としては、例えば、4種類のヌクレオチドの内、1種類をビオチン化ヌクレオチド（例えば、ビオチン化dUTP又はビオチン化UTP）に置き換えて実施するニックトランスレーション法又はプライマー伸長法、あるいは、4種類のヌクレオチドの内、1種類をアミノ化ヌクレオチド（例えば、アミノ-7-dUTP）に置き換えてDNA合成を行ない、得られた修飾DNAと適当なビオチン誘導体とを反応させる方法を挙げることができる。

前記ニックトランスレーション法又はプライマー伸長法に用いるビオチン化dUTP又はビオチン化UTPとして、例えば、dUTP又はUTPのピリミジン環の5位の炭素原子にリンカーを介してビオチンを結合させたものが市販されており、それを使用することができる。

更に、本発明において使用することのできるビオチン導入結合成分の内、結合成分がタンパク質又は核酸以外の化合物であるものについては、公知の方法を用いて、結合成分にビオチンを導入することにより調製することができる。

本発明のビオチン-アビジン-ビオチン型複合体においては、同種又は異種のビオチン導入物少なくとも2個と、前記ビオチン導入物の間に挟まれた架橋アビジン1個とを含む限り、前記ビオチン導入物の組み合わせは特に限定されるものではなく、例えば、ビオチン導入結合成分とビオチン導入標識物質との組み合わせ、ビオチン導入結合成分と、それと同種又は異種のビオチン導入結合成分との組み合わせ、あるいは、ビオチン導入標識物質と、それと同種又は異種のビオチン導入標識物質との組み合わせを挙げることができ、ビオチン導入結合成分とビオチン導入標識物質との組み合わせを用いることが好ましい。

更に、本発明において使用するビオチン導入結合成分としては、1分子中に含まれるビオチン数が1であるビオチン導入結合成分（すなわち、結合成分1分子に対してビオチン1分子を導入したビオチン導入結合成分）が好ましく、本発明の好適態様においては、ビオチン導入結合成分として、ビオチン導入抗体フラグメントF a b'を用いることができる。前記ビオチン導入抗体フラグメントF a b'は、分析対象化合物に特異的に結合する抗体（モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体の両方を含む）から得られる抗体フラグメントF a b'に、ビオチン1分子を共有結合により導入したものである。

前記抗体フラグメントF a b'は、抗体をペプシンで消化することにより得られる抗体フラグメントF (a b')₂を、更に還元剤（例えば、β-メルカプトエタノール又はメルカプトエチルアミン）で還元することにより調製することができる。すなわち、抗体分子のヒンジ領域には、2本のH鎖を連結するS-S結合1個が存在しており、このS-S結合のC末端側下流で、ペプシンによる分解を受けるので、抗体フラグメントF (a b')₂のC末端側領域には、前記S-S結合が残っている。続いて、還元剤により前記S-S結合を還元すると、抗体フラグメントF (a b')₂1分子から、C末端側領域にSH基1つを有する抗体フラグメントF a b'2分子が生じる。

このようにして得られたSH基1つを有する抗体フラグメントF a b'と、マレイミド基を有するビオチン誘導体とを反応させると、抗体フラグメントF a b'1分子当たり、ビオチン1分子が導入されたビオチン導入抗体フラグメントF a b'を得ることができる。

本発明において使用することのできるビオチン導入抗原は、抗原に、ビオチン 1 分子を共有結合により導入したものであることが好ましい。このようなビオチン導入抗原は、ビオチン導入酵素に関して説明した前記の調製方法、すなわち、化学的修飾法又は遺伝子操作法を用いて調製することができる。

本発明のビオチン-アビジン-ビオチン型複合体は、これに限定されるものではないが、例えば、本発明の製造方法により、調製することができる。本発明の製造方法においては、予め、それぞれ別々に調製した架橋アビジンと同種又は異種のビオチン導入物とを、一度に同時に、あるいは、順次、結合させることにより、本発明のビオチン-アビジン-ビオチン型複合体を形成させる。

本発明のビオチン-アビジン-ビオチン型複合体は、例えば、本発明の分析方法に用いることができる。本発明においては、分析対象化合物に応じて、適宜、適当なビオチン導入物（特にはビオチン導入結合成分）を選択することができる。例えば、分析対象化合物が抗原である場合には、その抗原に特異的に反応する抗体又は抗体フラグメント〔例えば、F a b、F a b'、F (a b')₂、又はF v〕にビオチンを導入したビオチン導入抗体又はビオチン導入抗体フラグメントを；分析対象化合物が抗体である場合には、その抗体が認識する抗原にビオチンを導入したビオチン導入抗原を；分析対象化合物がDNA又はRNAである場合には、それに相補的なDNA又はRNAにビオチンを導入したビオチン導入DNA又はビオチン導入RNAを；分析対象化合物が受容体である場合には、その受容体に対するリガンドにビオチンを導入したビオチン導入リガンドを；分析対象化合物が受容体のリガンドである場合には、そのリガンドに対する受容体にビオチンを導入したビオチン導入受容体を；分析対象化合物が酵素である場合には、その酵素に対するリガンドにビオチンを導入したビオチン導入リガンドを；そして、分析対象化合物が酵素のリガンドである場合には、その酵素にビオチンを導入したビオチン導入酵素を、それぞれ使用することができる。

以下、ビオチン導入結合成分として、ビオチン導入抗体フラグメントF a b'を使用し、ビオチン導入標識物質として、ビオチン導入酵素を使用する場合の態様に主に基づいて、本発明（本発明の分析方法、本発明の分析用試薬、及び本発明の分析用キット）を更に説明する。

例えば、これまで説明した方法により得られた（１）ビオチン導入抗体フラグメントF a b' と、（２）架橋アビジンと、（３）ビオチン導入酵素とを、適当な比率で混合することにより、酵素活性及び抗体活性を共に維持した状態で酵素標識化抗体を得ることができる。これらの酵素標識化抗体を、本発明の分析方法で使用する事ができる。

また、（１）ビオチン導入抗体フラグメントF a b' と、（２）架橋アビジンと、（３）ビオチン導入酵素とは、それぞれ別々に使用することもできる。例えば、抗体固定化担体と分析対象化合物（抗原）とを反応させた後に、

（a）前記の３種類の試薬をこの順に添加し、三段階で反応させることもできるし、

（b）ビオチン導入抗体フラグメントF a b' と架橋アビジンとを予め混合しておいたものを反応させた後に、ビオチン導入酵素を反応させ、二段階で反応させることもできるし、あるいは、

（c）ビオチン導入抗体フラグメントF a b' を反応させた後に、架橋アビジンとビオチン導入酵素とを予め混合しておいたものを反応させ、二段階で反応させることもできる。

これらの３種類の試薬を、予め全て混合して使用するか、あるいは、別々に使用するかは、それぞれの測定系に応じて適宜決定することができる。

本発明の分析方法では、（１）ビオチン導入抗体フラグメントF a b' 、（２）架橋アビジン、及び（３）ビオチン導入酵素を使用すること以外は、従来公知の免疫学的分析方法、例えば、サンドイッチ法又は競合法にそのまま適用することができる。

例えば、サンドイッチ法を利用し、（１）ビオチン導入抗体フラグメントF a b' と、（２）架橋アビジンと、（３）ビオチン導入酵素とを、適当な比率で混合して得られた酵素標識化抗体を用いる本発明の分析方法では、具体的には、ビオチン導入抗体フラグメントF a b' とは異なるエピトープで分析対象化合物と反応する抗体又は抗体フラグメントを適当な不溶性担体に固定化する（第１抗体）。次に、不溶性担体と被検試料との非特異的結合を避けるために、適当なブロッキング剤〔例えば、ウシ血清アルブミン（B S A）やゼラチン等〕で不溶性担

体の表面を被覆する。続いて、被検試料を加えて一定時間（例えば、5分～3時間）及び一定温度（例えば、4℃～40℃、好ましくは室温付近）で接触させ、反応させる（1次反応）。続いて、3種類の試薬の混合物である前記酵素標識化抗体を加えて一定時間（例えば、5分～3時間）及び一定温度（例えば、4℃～40℃、好ましくは室温付近）で接触させ反応させる（2次反応）。これを適当な洗浄液（例えば、界面活性剤を含む生理食塩水）で洗浄してから、不溶性担体上に存在する酵素標識化抗体の量を定量する。その値から、被検試料中の分析対象化合物の量を算出することができる。

本発明の分析方法においては、3種類の試薬の混合物である酵素標識化抗体を添加して一段階で反応させる代わりに、先に説明したように、3種類の試薬を別々に加えて二段階又は三段階で反応させることもできる。

本発明の分析方法に使用する架橋アビジンは、分子内架橋により各サブユニットが共有結合により連結されているので、（1）ビオチン導入抗体フラグメントF a b' と（2）架橋アビジンと（3）ビオチン導入酵素とを適当な比率で混合し、酵素標識化抗体を調製しても、その酵素活性及び抗体活性を安定に維持することができる。それに対して、架橋されていないアビジンを使用する従来公知の酵素標識化抗体（すなわち、ビオチン導入抗体－アビジン－ビオチン導入酵素複合体）では、酵素標識化抗体としての反応性が著しく低下する。この理由は、アビジン1分子にビオチン2分子（ビオチン導入抗体及びビオチン導入酵素）が結合すると、高い熱を加えた場合と同様に、アビジンに強い力が加わり、サブユニットへと開裂してしまうためと考えられる。

更に、本発明の分析方法では、1分子中に含まれるビオチン数が1であるビオチン導入抗体フラグメントF a b' 及びビオチン導入酵素を使用すると、酵素標識化抗体の酵素活性及び抗体活性を更に安定に維持することができる。もしも、抗体フラグメントF a b'、抗原、又は酵素中に複数のビオチン分子が存在すると仮定すると、アビジンを介して連鎖的に結合反応が進行し、酵素標識化抗体が巨大分子化し、沈殿形成など好ましくない反応を起こすことが予想されるからである。

本発明の分析用試薬は、架橋アビジンを含む。本発明の分析用試薬は、他の試

薬、例えば、ビオチン導入抗体フラグメントF a b' 及びビオチン導入酵素と組み合わせて、本発明の分析方法に用いることができる。

本発明の分析用キットは、架橋アビジン及びビオチン化剤を含む。前記ビオチン化剤としては、従来公知のビオチン化剤を使用することができ、例えば、N-ビオチノイル-N'-(6-マレイミドヘキサノイル)-ヒドラジド、又はビオチニル-ε-アミノカプロン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル等を挙げることができる。前記分析用キットとは別に用意した抗体フラグメントF a b' 及び酵素を、前記ビオチン化剤によりビオチン化して得られるビオチン導入抗体フラグメントF a b' 及びビオチン導入酵素と、前記分析用キットに含まれる架橋アビジンとを組み合わせ、本発明の分析方法に用いることができる。

本発明の分析用キットは、架橋アビジン及びビオチン化剤に加え、ビオチン導入標識物質（例えば、ビオチン導入酵素）を更に含むことができる。本発明の分析用キットは、架橋アビジン、ビオチン導入標識物質、及びビオチン化剤をそれぞれ別々の試薬として含むこともできるし、あるいは、架橋アビジンとビオチン導入標識物質とを予め混合した混合物、及び単独のビオチン化剤として含むこともできる。

また、本発明の分析用キットは、前記ビオチン化剤に代えて、ビオチン導入抗体フラグメントF a b' 及びビオチン導入標識物質（例えば、ビオチン導入酵素）を含む構成とすることもできる。すなわち、本発明の別の分析用キットは、（1）ビオチン導入抗体フラグメントF a b'、（2）架橋アビジン、及び（3）ビオチン導入標識物質を含む。本発明の分析用キットは、（1）ビオチン導入抗体フラグメントF a b'、（2）架橋アビジン、及び（3）ビオチン導入標識物質をそれぞれ別々の試薬として含むこともできるし、あるいは、2以上の試薬を予め混合した混合物として含むこともできる。後者の例示としては、例えば、ビオチン導入抗体フラグメントF a b' と架橋アビジンとビオチン導入標識物質との混合物を含む分析用キット、ビオチン導入抗体フラグメントF a b' と架橋アビジンとの混合物、及び単独のビオチン導入標識物質を含む分析用キット、あるいは、単独のビオチン導入抗体フラグメントF a b'、及び架橋アビジンとビオチン導入標識物質との混合物を含む分析用キットを挙げることができる。

本発明の分析用キットは、それ単独で、あるいは、所望により他の試薬と組み合わせて、本発明の分析方法に使用することができる。

以上、ビオチン導入結合成分として、ビオチン導入抗体フラグメントF a b'を使用し、ビオチン導入標識物質として、ビオチン導入酵素を使用する態様に基づいて本発明を主に説明したが、前記ビオチン導入抗体フラグメントF a b'の代わりに、ビオチン導入抗原を用いても本発明を実施することができる。以下、ビオチン導入標識物質として、ビオチン導入酵素を用いる態様について説明する。

例えば、(1) ビオチン導入抗原と、(2) 架橋アビジンと、(3) ビオチン導入酵素とを、適当な比率で混合して得られた酵素標識化抗原を用いる本発明の分析方法では、例えば、競合法により抗原を免疫学的に分析することができる。具体的には、分析対象化合物と反応する抗体又は抗体フラグメントを適当な不溶性担体に固定化する(第1抗体)。次に、不溶性担体と被検試料との非特異的結合を避けるために、適当なブロッキング剤[例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)やゼラチン等]で不溶性担体の表面を被覆する。続いて、3種類の試薬の混合物である前記酵素標識化抗原と、被検試料とを加えて一定時間(例えば、5分～3時間)及び一定温度(例えば、4℃～40℃、好ましくは室温付近)で接触させ、反応させる。これを適当な洗浄液(例えば、界面活性剤を含む生理食塩水)で洗浄してから、不溶性担体上に存在する酵素標識化抗原の量を定量する。その値から、被検試料中の分析対象化合物の量を算出することができる。

本発明の分析方法においては、3種類の試薬の混合物である酵素標識化抗原を添加して一段階で反応させる代わりに、先に説明したように、3種類の試薬を別々に加えて二段階又は三段階で反応させることもできる。

更には、ビオチン導入抗体フラグメントF a b'又はビオチン導入抗原に代えて、その他のビオチン導入結合成分、例えば、ビオチン導入抗体、ビオチン導入抗体フラグメント、ビオチン導入DNA、ビオチン導入RNA、ビオチン導入受容体、ビオチン導入酵素、ビオチン導入リガンド(受容体に対するリガンド及び酵素に対するリガンドを含む)、ビオチン導入酵素アナログ、酵素アナログの元となる酵素の基質にビオチンを導入したもの、ビオチン導入レクチン、又はビオチン導入糖を用いても、同様に本発明を実施することができる。

また、ビオチン導入酵素に代えて、その他のビオチン導入標識物質、例えば、ビオチン導入蛍光物質若しくはビオチン導入蛍光物質結合タンパク質、ビオチン導入発光物質若しくはビオチン導入発光物質結合タンパク質、又はビオチン導入放射性同位元素を用いても、同様に本発明を実施することができる。

実施例

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例 1

(1) ビオチン導入抗体フラグメント F a b' の調製

ヒト α -フェトプロテイン (A F P) をウサギに対し免疫して得られた抗血清から、A F P 固定化セファロース 4 B を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーで特異抗体 I g G 分画を得た。

この特異抗体 I g G 分画 [0.1 m o l / l 酢酸緩衝液 (p H 4.5)] に 2 % 重量のペプシンを加え、37℃の孵卵器で一夜消化を行い、ゲルクロマトグラフィーで分子量 10 万の抗体フラグメント F (a b')₂ 分画を得た。

50 m m o l / l 酢酸緩衝液 (p H 5.0) に対して透析した F (a b')₂ 分画 5 m g (1 m l) に、0.25 m o l / l -2-メルカプトエチルアミン [50 m m o l / l 酢酸緩衝液 (p H 5.0)] 50 μ l を加え、37℃で 90 分間還元した。得られた反応液を、1 m m o l / l エチレンジアミン四酢酸 (E D T A) を含む 50 m m o l / l リン酸緩衝液 (p H 7.0) で平衡化したセファデックス G-25 カラム (1.5 \times 13 c m) に通し、ボイドボリュームに溶出される抗体フラグメント F a b' 分画をプールした。

この抗体フラグメント F a b' 分画に、ジメチルホルムアミド 0.1 m l に溶解した N-ビオチノイル-N'-(6-マレイミドヘキサノイル)-ヒドラジド 0.4 m g を加え、室温で一夜静置反応させた後、生理食塩水で平衡化したセファデックス G-25 カラム (1.5 \times 13 c m) に通し、ボイドボリュームに溶出されるビオチン導入抗体フラグメント F a b' をプールした。

(2) 架橋ストレプトアビジンの調製

0.1 mol/l リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1 ml に溶解した精製ストレプトアビジン 1 mg に、1% グルタルアルデヒド溶液 [0.1 mol/l リン酸緩衝液 (pH 7.0)] 20 μ l を加え、混合した後、4℃で16時間静置反応した。反応混液に、0.1 mol/l リン酸緩衝液 (pH 7.0) で調製した 4 mg/ml 水素化ホウ素ナトリウム液 20 μ l を加え、室温で4時間静置反応することにより、アルデヒドを還元した。反応混液を 0.3 mol/l 食塩水で平衡化したセファデックス G-25 カラム (1.5 × 15 cm) に通し、ボイドボリュームに溶出される架橋ストレプトアビジンをプールした。

(3) 抗AFPモノクローナル抗体のコーティング

50 mmol/l 炭酸緩衝液 (pH 9.5) で 5 μ g/ml に調整した抗AFPモノクローナル抗体 (オリエンタル酵母社) 100 μ l を、白色96穴プレートの各ウェルに分注し、37℃で2時間振盪コーティングを行った後、洗浄液 [0.1% トウイーン20を含む20 mmol/l トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5)] で洗浄し、以下の工程に用いた。

(4) 酵素標識化抗体の調製

前記実施例1 (1) で得られたビオチン導入抗体フラグメント Fab' (最終濃度 = 0.1 μ g/ml) と、前記実施例1 (2) で得られた架橋ストレプトアビジン (最終濃度 = 1.2 μ g/ml) と、ビオチン導入ルシフェラーゼ-ビオチンアクセプター融合タンパク質 (キッコーマン社) (最終濃度 = 0.07 μ g/ml) とを、5% グリセロール、1% ウシ血清アルブミン (BSA)、及び 1 mmol/l EDTA を含む 50 mmol/l HEPES 緩衝液 (pH 7.5) 中で混合し、室温で2時間静置反応してから酵素標識化抗体として、以下の反応に用いた。

(5) ELISA法によるAFPの測定

反応緩衝液 (0.15 mol/l 食塩を含む前記洗浄液) で所定濃度 (1 pg/ml, 10 pg/ml, 及び 100 pg/ml) に希釈した標準AFP溶液 100 μ l を抗体コートウェルに分注し、37℃で1時間振盪反応を行った。洗浄液で4回洗浄した後、実施例1 (4) で調製した酵素標識化抗体 100 μ l を分注し、37℃で1時間振盪反応を行った。洗浄液で4回洗浄した後、発光検出器

にセットし、0.2 mg/ml ルシフェリン、40 mmol/l ATP、及び150 mmol/l 硫酸マグネシウムを含む50 mmol/l HEPES 緩衝液 (pH 7.5) 100 μ l を基質として加え、10秒間の積算発光量を測定した。

結果を図1に示す。図1から明らかなように、非常に低濃度のAFPに対して発光量のレスポンスが得られた。

このようにストレプトアビジンを架橋剤処理することにより、ビオチン導入抗体フラグメントFab' とビオチン導入酵素との間を、安定に結合することができることが示された。

比較例1

比較例として、実施例1(2)で調製した架橋ストレプトアビジンの代わりに、架橋処理を行っていないストレプトアビジンを使用すること以外は、前記実施例1(4)及び実施例1(5)の手順を繰り返した。結果を図2に示す。図2から明らかなように、AFP量に対する発光のレスポンスがほとんど見られず、架橋されていないストレプトアビジンでは、ビオチン導入抗体フラグメントFab' とビオチン導入酵素との間をうまく結合することができないことが確認された。

産業上の利用可能性

本発明によれば、アビジン-ビオチン反応の長所を生かしながら、迅速且つ簡易に、しかも、正確に分析対象化合物の分析を実施することができる。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

請 求 の 範 囲

1. 同種又は異種のビオチン導入物少なくとも2個と、前記ビオチン導入物の間に挟まれた架橋アビジン1個とを含む、ビオチンーアビジンービオチン型複合体。
2. 少なくとも1個のビオチン導入物が、ビオチン導入結合成分であり、少なくとも1個のビオチン導入物が、ビオチン導入標識物質である、請求項1に記載のビオチンーアビジンービオチン型複合体。
3. (1) アビジンを架橋剤で処理することにより、架橋アビジンを調製する工程、
(2) 同種又は異種のビオチン導入対象物をビオチン化することにより、同種又は異種のビオチン導入物を調製する工程、及び
(3) 前記架橋アビジンと、同種又は異種の前記ビオチン導入物とを結合させることにより、請求項1に記載のビオチンーアビジンービオチン型複合体を形成させる工程
を含むことを特徴とする、請求項1に記載のビオチンーアビジンービオチン型複合体の製造方法。
4. 同種又は異種のビオチン導入物と、架橋アビジンとを使用することを特徴とする、分析方法。
5. (1) ビオチン導入結合成分、(2) 架橋アビジン、及び(3) ビオチン導入標識物質を使用することを特徴とする、分析方法。
6. (1) 分析対象物を含む可能性のある被検試料、前記分析対象物と特異的に結合可能なビオチン導入結合成分、架橋アビジン、及びビオチン導入標識物質を任意の順序で接触させることにより、前記分析対象物とビオチン導入結合成分と架橋アビジンとビオチン導入標識物質との複合体を形成させる工程、及び
(2) 前記複合体における前記標識物質に由来する信号を分析する工程
を含むことを特徴とする、前記分析対象物の分析方法。
7. 結合成分が、抗体、抗体フラグメント、抗原、DNA、RNA、受容体、受容体に対するリガンド、酵素、酵素に対するリガンド、酵素アナログ、酵素アナログの元となる酵素の基質、レクチン、又は糖である、請求項5又は6に記載の

分析方法。

8. 抗体フラグメントが F a b' である、請求項 7 に記載の分析方法。

9. ビオチン導入標識物質が、ビオチン導入酵素、ビオチン導入蛍光物質若しくはビオチン導入蛍光物質結合タンパク質、ビオチン導入発光物質若しくはビオチン導入発光物質結合タンパク質、又はビオチン導入放射性同位元素である、請求項 5 ～ 8 のいずれか一項に記載の分析方法。

10. 前記ビオチン導入酵素が、ビオチンが導入された酵素ービオチンアクセプター融合タンパク質である、請求項 9 に記載の分析方法。

11. 前記ビオチン導入酵素が、ビオチン導入ルシフェラーゼである、請求項 9 に記載の分析方法。

12. 架橋アビジンが、架橋卵白アビジン、架橋ストレプトアビジン、又は架橋リコンビナントアビジンである、請求項 4 ～ 11 のいずれか一項に記載の分析方法。

13. 架橋アビジンを含むことを特徴とする、分析用試薬。

14. 架橋アビジン及びビオチン化剤を含むことを特徴とする、分析用キット。

15. ビオチン導入標識物質を更に含む、請求項 14 に記載の分析用キット。

16. 架橋アビジンとビオチン導入標識物質との混合物、及びビオチン化剤を含むことを特徴とする、分析用キット。

17. (1) ビオチン導入結合成分、(2) 架橋アビジン、及び(3) ビオチン導入標識物質を含むことを特徴とする、分析用キット。

18. 結合成分が、抗体、抗体フラグメント、抗原、DNA、RNA、受容体、受容体に対するリガンド、酵素、酵素に対するリガンド、酵素アナログ、酵素アナログの元となる酵素の基質、レクチン、又は糖である、請求項 17 に記載の分析用キット。

19. 抗体フラグメントが F a b' である、請求項 18 に記載の分析用キット。

20. (1) ビオチン導入抗体フラグメント F a b' 、(2) 架橋アビジン、及び(3) ビオチン導入標識物質を含むことを特徴とする、分析用キット。

21. (1) ビオチン導入抗体フラグメント F a b' と(2) 架橋アビジンと(3) ビオチン導入標識物質とを、それらの混合物の形で含む、請求項 20 に記載

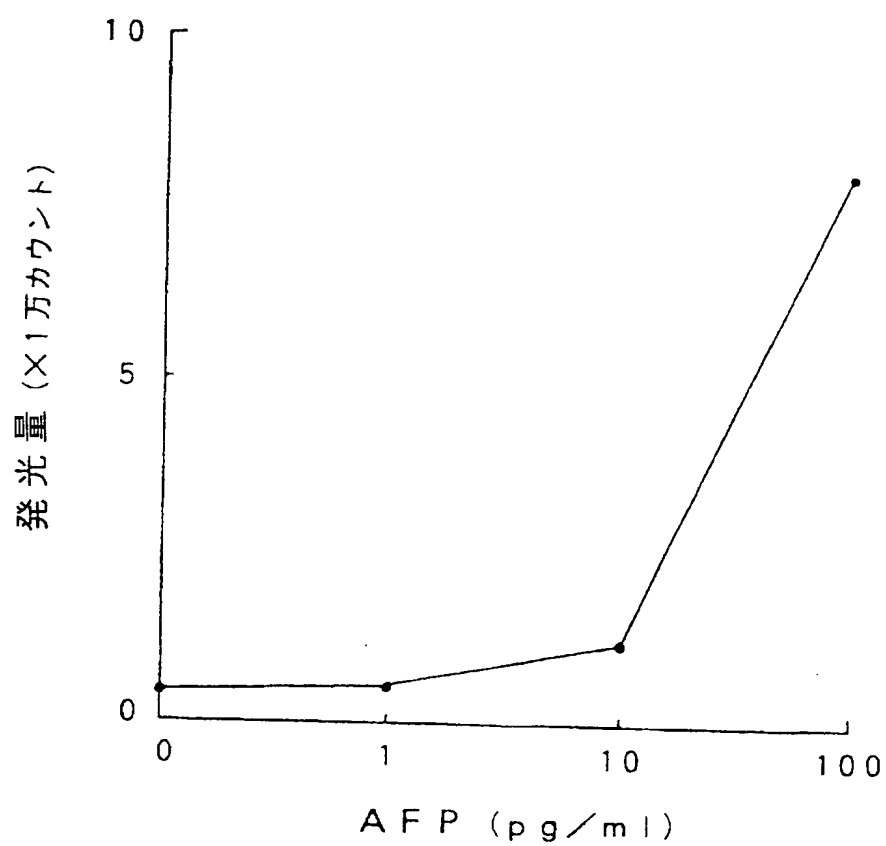
の分析用キット。

22. (1) ビオチン導入抗体フラグメント F a b' と (2) 架橋アビジンとを、それらの混合物の形で含む、請求項 20 に記載の分析用キット。

23. (2) 架橋アビジンと (3) ビオチン導入標識物質とを、それらの混合物の形で含む、請求項 20 に記載の分析用キット。

1 / 2

FIG. 1





2

2

2

2

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 8-308578, A (キッコーマン株式会社) 26. 11 月. 1996 (26. 11. 96) 特許請求の範囲&US, 581 4465, A&US, 5843746, A	10, 11

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/06172

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁶ G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁶ G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-1999年
日本国登録実用新案公報 1994-1999年
日本国実用新案登録公報 1996-1999年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSYS (DIALOG)
WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Nature Biotechnology, Vol. 14, No. 8 (1996) p. 1007-1011	13 1-12, 14-23
Y -	J P, 59-142466, A (富士レビオ株式会社) 15. 8 月. 1984 (15. 08. 84) 特許請求の範囲 (ファミリーな し)	1-12, 14-23
Y	J P, 3-128460, A (日本商事株式会社) 31. 5月. 1 991 (31. 05. 91) 特許請求の範囲 & E P, 40557 8, A & U S, 5378608, A	8, 19-23

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
29. 11. 99

国際調査報告の発送日

07.12.99

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
山村 祥子

印

2 J 9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3252



2

11

1

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06172

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁶ G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl.⁶ G01N33/53Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1999
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1999 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1999Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSYS (DIALOG)
WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Nature Biotechnology, Vol.14, No.8 (1996) p.1007-1011	13 1-12, 14-23
Y	JP, 59-142466, A (FUJIREBIO INC.), 15 August, 1984 (15.08.84), Claims (Family: none)	1-12, 14-23
Y	JP, 3-128460, A (Nippon Shoji K.K.), 31 May, 1991 (31.05.91), Claims & EP, 405578, A & US, 5378608, A	8, 19-23
Y	JP, 8-308578, A (Kikkoman Corporation), 26 November, 1996 (26.11.96), Claims & US, 5814465, A & US, 5843746, A	10, 11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
29 November, 1999 (29.11.99)Date of mailing of the international search report
07 December, 1999 (07.12.99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



2 / 2

FIG. 2

